

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	進藤 稔弘
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 TGF- β 1 promotes expression of fibrosis-related genes through the induction of histone variant H3.3 and histone chaperone HIRA (TGF- β 1はヒストンバリエント H3.3 とヒストンシャペロン HIRA の誘導を介して線維化関連遺伝子発現を促進する)			
論文審査担当者			
主査	教授	服部 登	印
審査委員	教授	東 幸仁	
審査委員	講師	仙谷 和弘	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>クロマチンの基本構成単位は、147塩基対のDNAがヒストンH2A、H2B、H3、H4、各2分子ずつからなるコアヒストンの周囲に1.75回巻きついて形成されるヌクレオソームである。コアヒストンのアミノN末端領域はアセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化などの化学修飾を受け、修飾されたヒストンはそれを認識して結合する因子のターゲットとなる。また、ヒストンH2A、H2B、H3には、ヒストンバリエントとよばれる亜種が通常型ヒストンとは異なった非対立遺伝子としてゲノムDNAにコードされている。これらのヒストンバリエントが特定のゲノムDNA領域に取り込まれることによって、特定の領域での遺伝子発現調整がクロマチン構造を介して行うことが明らかとなってきた。なかでも、H3.3は、転写が活発に行われている遺伝子が存在するクロマチン領域に、細胞周期に関係なく取り込まれる。ヒストンバリエントを制御しているのが、ヒストンシャペロンと呼ばれるタンパク質群であり、H3.3と特異性の高いものとしてHIRAが挙げられる。H3.3は転写活性を亢進するため、腎線維化の進展過程におけるtransforming growth factor (TGF)-β1による細胞外基質の産生などに関与している可能性がある。本論文では、H3.3と特異性の高いHIRAの腎線維化への関与を検討した。</p> <p>線維化のモデルとして、マウス片側尿管結紮モデル（UUO: unilateral ureter obstruction）を用いた。7日後に屠殺し、UUOマウスにおける腎線維化とH3.3、HIRAの関連を検討した。UUOマウスにおいて、腎線維化が確認され、さらにH3.3とHIRAのmRNAとタンパク発現がともに亢進していた。次に、UUOマウスにTGF-β1の中和抗体を腹腔内投与し、腎線維化の過程でH3.3、HIRAとTGF-β1シグナル経路の関連を検討した。UUOマウスにTGF-β1の中和抗体を腹腔内投与すると、</p>			

腎線維化が抑制されるとともに H3.3、HIRA の mRNA とタンパク発現も抑制されており、H3.3、HIRA 発現が TGF- β 1 シグナル経路と関連することが示唆された。また、ラットの腎近位尿細管上皮細胞 (NRK-52E) と腎間質線維芽細胞 (NRK-49F) を用いた培養実験系では、TGF- β 1 刺激による H3.3 と HIRA のタンパク発現量を様々な TGF- β 1 濃度で経時的に検討した。NRK-52E と NRK-49F に TGF- β 1 刺激すると、刺激後 24 時間をピークとした経時的な H3.3 と HIRA のタンパク発現量の増加を認めた。続いて、TGF- β 1 刺激した NRK-52E に Smad3 の siRNA を投与し、TGF- β 1 シグナル経路における H3.3 と HIRA 発現の詳細なメカニズムについて検討した。TGF- β 1 刺激した NRK-52E に Smad3 の siRNA を投与すると、H3.3 と HIRA の発現が抑制され、TGF- β 1 シグナルにおいて、H3.3、HIRA 発現は Smad 経路を介していることが示唆された。さらに、TGF- β 1 刺激した NRK-52E に HIRA の siRNA を投与し、HIRA をノックダウンした際の H3.3 や、線維化関連遺伝子発現の変化を検討した。TGF- β 1 刺激した NRK-52E に HIRA の siRNA を投与し、HIRA をノックダウンすると、H3.3 発現が抑制され、さらに、線維化マーカーである α -Smooth muscle actin の発現も抑制されていた。TGF- β 1 刺激した NRK-52E に TGF- β 1 中和抗体を投与し、H3.3 と HIRA の抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行ったところ、TGF- β 1 刺激により線維化関連遺伝子の Smad 結合領域において、H3.3、HIRA が増加していた。TGF- β 1 中和抗体投与によって、その増加が抑制されたことから、TGF- β 1 が H3.3、HIRA の発現、誘導を介して、線維化関連遺伝子発現の調整をしていることが考えられた。最後に、ヒトの腎生検組織を用いて、ヒトにおける腎線維化と H3.3 と HIRA の関連を検討したところ、腎線維化の程度と H3.3、HIRA は、ともに正の相関関係を示した。

以上の結果から本論文は、TGF- β 1 が H3.3、HIRA の発現、誘導を介して線維化関連遺伝子発現を促進することを明らかにした。さらに、ヒトにおいても、腎線維化と H3.3、HIRA の関連が示され、HIRA が慢性腎不全による腎線維化の新たな治療ターゲットとなりうる可能性が示唆された。

よって、審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値のあるものと認めた。

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	進藤 稔弘
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 TGF-β1 promotes expression of fibrosis-related genes through the induction of histone variant H3.3 and histone chaperone HIRA (TGF-β1 はヒストンバリエント H3.3 とヒストンシャペロン HIRA の誘導を介して線維化関連遺伝子発現を促進する)			
最終試験担当者			
主査	教授	服部	登 印
審査委員	教授	東	幸 仁
審査委員	講師	仙谷	和 弘
〔最終試験の結果の要旨〕			
判 定 合 格			
<p>上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成31年1月7日の第77回広島大学研究科発表会（医学）及び平成31年1月4日日本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 非腫瘍性の腎疾患における H3.3 の genetic な変化の有無 2 IgA 腎症以外の腎疾患における H3.3、HIRA の関与 3 H3.3、HIRA 発現と腎線維化のメカニズム 4 HIRA のヒストンシャペロン以外の作用 5 UUO モデルの妥当性と血管系への影響 6 HIRA を阻害することによる全身への影響と創薬の可能性 <p>これら試問に対して適切に回答し、本委員会が学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。</p>			